昆虫神经毒素的研究：各种神经毒剂引起毒素的产生

张宗炳　吴士雄　程念胜　姚逸红
（北京大学生物系）

摘要　用五类（七种）神经毒性的杀虫药剂，对美洲蜚蠊测定了它们能否引起血淋巴中毒素的产生。DDT、溴氰菊酯及六六六均能引起血淋巴中毒素的产生，而 E605、西维因、巴丹及杀虫脒均无此效果。纸层析及薄层层析，用标准样品（酪氨酸、酪胺、苯乙胺、L-亮氨酸及异戊胺）作比较，测定了这一产生的血淋巴中的毒素乃是酪胺，或主要是酪胺。增效试验，证明了杀虫脒与 DDT 或溴氰菊酯合用时，能增加酪胺的产量。讨论了这一毒素产生的条件，以及这一毒素有可能不是单一成分，而是几种单胺及氨基酸的复合物，但酪胺为其主要成分。

关键词　神经毒素　酪胺

在前一报告中（张宗炳、吴士雄、金恒亮，1982），我们报道了 DDT 中毒的美洲蜚蠊的血淋巴中出现的神经毒素乃是酪胺，或主要是酪胺。在 1952 年 Sternburg 和 Kearns 的报告中，这一出现的神经毒素已证明与 DDT 无关，不是 DDT 的代谢物；后来的研究（Sternburg 等，1959；Blum 和 Kearns，1956）还证明了这一毒素在其它神经毒剂的处理后也会出现，如除虫菊酯、TEPP，甚至于强烈的电刺激也能造成这一毒素的出现。因此，值得研讨的一个问题就是：是否所有的神经毒剂都能引起这一毒素的产生，是否它是所有的神经毒剂的一个共同的毒杀机制。

为此，我们试验了几类重要的神经毒剂，观察它们对于引起这一毒素的产生的效果。根据张宗炳（1981），神经毒剂可分为主要的六类：①轴突神经毒剂，如 DDT 及除虫菊酯类化合物；②刺激乙酰胆碱使其过度释放的毒剂，如六六六及狄氏剂等；③胆碱酯酶抑制剂，如有机磷及氨基甲酸酯类，④占领乙酰胆碱受体的毒剂，如烟碱及巴丹等；⑤抑制胆碱乙酰转移酶的毒剂，这一类化合物尚未商品化，主要是用作增效剂；及⑥抑制单胺氧化酶的毒剂，如杀虫脒等甲脒类化合物。除了第⑤类，我们没有取得样品外，对于其它五类都进行了试验。

材 料 与 方 法

一、药剂

P,P′-DDT 纯品，中国科学院动物研究所毒理室供给；

西维因纯品，中国科学院动物研究所毒理室供给；

本文于 1982 年 9 月收到。

林丹纯品，中国科学院动物研究所毒理室供给；

E605 原油，Bayer 公司产品；

溴氰菊酯纯品，农牧渔业部农药检定所提供；

巴丹 50% 水溶性粉剂，武田工业株式会社产品；

杀虫脒 50% 乳剂，Ciba-Geigy 公司产品，

二、标准样品

L-亮氨酸 98.5%，北京化工厂产品；

酪胺 99%，瑞士 Fluka 公司产品；

苯乙胺 99%，瑞士 Fluka 公司产品；

异戊胺 ≥98%，北京化工厂产品；

酪氨酸纯品，中国医学科学院提供。

三、供试昆虫

美洲蜚蠊 *Periplaneta americana* 成虫，饲养方法等见张宗炳、吴士雄、金恒亮(1982)，供试昆虫用虫体大小比较一致的成虫，性别不分。

四、方法

① 症象学观察 分别取七组蜚蠊，每组 60 头，除一组作为对照外，其余六组分别用 DDT、溴氰菊酯、西维因、林丹、巴丹、杀虫脒处理，所用浓度不同(见表 2)，但均用 10 微升，以微量进样器滴加在昆虫前胸背板上。这一浓度均为致死中量，可以部分引起昆虫死亡，因而便于观察昆虫中毒征象。各药剂，除巴丹外均溶于丙酮，巴丹用丙酮与水混合物(4:1)。

② 血淋巴的提取 同张宗炳、吴士雄、金恒亮(1982)。

③ 层析分离

a. 纸层析 用新华 1 字滤纸，层析分别用三个系统：(1)丙醇:水:甲酸(8:1:1)；(2)正丁醇:乙醇:水(4:1:5)；(3)苯:水:正丁醇:甲醇(1:1:1:2)。

b. 薄层层析 固定相支持剂用纤维素，用 10 克纤维素粉与 50 毫升丙酮调成糊状，涂成薄层。展开剂同上。

④ 杀虫脒与 DDT 及溴氰菊酯混用试验 为了测定杀虫脒对于毒素的产生有无影响，将杀虫脒加入 DDT 及溴氰菊酯中一同施用。浓度及用量见表 1。

表 1 DDT、溴氰菊酯与杀虫脒的混用浓度及用量

杀虫剂	DDT	DDT + 杀虫脒		溴氰菊酯	溴氰菊酯 + 杀虫脒	
		DDT	杀虫脒		溴氰菊酯	杀虫脒
浓度(毫克/毫升)	5	5	50	3×10^{-3}	3×10^{-3}	50
用量(微升/头)	3	3		3	3	

结果与分析

一、症象学的观察

症象学的观察结果见表 2。所以作症象观察的原因乃是因为症象与毒素的产生可能

有关。事实证明，在症象中引起极度兴奋的杀虫药剂，如 DDT、溴氰菊酯及林丹等才引起毒素的产生。其它一些神经毒剂，如西维因、巴丹、E605 等或只引起短暂的兴奋，或直接引起麻痹与击倒，它们都不引起毒素的产生。

根据 Blum 和 Kearns (1956)，除虫菊酯是引起毒素产生的，因此可以想象溴氰菊酯也会引起毒素的产生。但是，与 Sternburg 等 (1959) 的结果不同，E605 却与 TEPP 不同，E605 并不引起毒素的产生。六六六引起毒素的产生是可以想象的，因为 Sternburg 等 (1957, 1959) 报道狄氏剂可能也引起毒素的产生。但是，显然这里毒素的产生与作用机制的关系不大，而决定于毒剂是否引起极度兴奋。电刺激引起极度兴奋也能引起毒素的产生，而胆碱酯酶的抑制，乙酰胆碱受体的占领等如不引起极度兴奋，也不会引起毒素的产生。

表 2　不同神经毒剂引起美洲蜚蠊的中毒症象

药　剂	剂量与浓度	处　　理	中　毒　症　状
DDT	10mg/ml 3μl/头	点药后，放于 35℃，14 小时后，转入 15℃，击倒 4 小时后提取血液	在 35℃ 条件下，无中毒症象，移至 15℃ 后，几分钟内即出现异常兴奋，半小时后开始击倒，击倒后有痉挛现象，4—5 小时后，一部分死亡
溴氰菊酯	5.9×10^{-3}mg/ml 3μl/头	同上	在 35℃，6 分钟后出现兴奋症状，足和触角急剧摆动，移至 15℃ 下，5 分钟开始击倒，20 分钟内全部击倒，并出现痉挛现象
西维因	10mg/ml 3μl/头	室温下点药，击倒后 4 小时提取血液	点药后 20 分钟出现一定的兴奋现象，即振翅和骤然疾走，在 50—80 分钟内逐次击倒，并出现偶发性痉挛，有失水现象
E605	10mg/ml 5μl/头	同上	1 小时后，有一定的兴奋症象，骤然疾走，有咀嚼行为，2—2.5 小时内依次击倒，击倒后少活动，有失水现象
巴丹	20mg/ml 3μl/头	同上	点药后，7 分钟即有不协调动作，但无兴奋现象，12 分钟后，部分击倒，击倒后静止不动，犹如死亡，刺激时，足与触角能活动
林丹	10mg/ml 10μl/头	同上	有振翅及敌跑等兴奋现象，但较 DDT 及溴氰菊酯不明显，击倒后有痉挛现象
杀虫脒	10mg/ml 5μl/头	同上	因杀虫脒有驱避作用，虽无兴奋，但有较多的活动，10 分钟后有失水现象，触角上出现液珠，并用口净角，20—60 分钟后依次击倒，并有痉挛现象
DDT 加杀虫脒	DDT 5mg/ml 杀虫脒 50mg/ml 1:1 3μl/头	同 DDT	症象同 DDT，但出现较快
溴氰菊酯加杀虫脒	溴 3×10^{-3}mg/ml 杀 50mg/ml 3μl/头	同溴氰菊酯	症象同溴氰菊酯

二、毒素的层析分离与鉴定

我们实际上重复验证了张宗炳、吴士雄、金恒亮 (1982) 的工作。用酪氨酸、酪胺、苯乙胺、L-亮氨酸及异戊胺作为标准样品，对毒素进行了比较。结果如表 3、表 4，图谱见图 1、2、3 及 4。

a. 酪胺　在系统 I 及 II 中，对照及六组中均有相应点，但在系统 III 中，仅 DDT、溴

表 3　标准品在各系统的 Rf 值

层析系统	酪　胺	酪氨酸	亮氨酸	苯乙胺	异戊胺
I	0.70	0.46	0.83	0.82	0.86
II	0.61	0.35	0.62	0.71	0.75
III	0.86	0.56	0.78	0.86	0.88

表 4　各处理组血淋巴中与标准样相对应点的 Rf 值

标准样	系统	对照	DDT	溴氰菊酯	西维因	巴丹	杀虫脒	林丹**
酪　胺	I	0.67	0.70	0.68	0.68	0.67	0.69	0.69
	II	0.61	0.61	0.60	0.61	0.61	0.63	0.61
	III	—	0.87	0.88	—	—	—	0.88
酪氨酸	I	0.45	0.44	0.45	0.47	0.45	0.46	
	II	—*	—*	0.33	—*	0.33	0.35	
	III	0.53	0.54	0.53	0.54	0.56	0.55	
亮氨酸	I	0.85	0.84	0.82	0.83	0.84	0.84	
	II	0.61	0.61	0.60	0.61	0.61	0.63	
	III	0.74	0.74	0.76	0.75	0.77	0.78	
苯乙胺	I	0.85	0.84	0.82	0.83	0.84	0.84	
	II	0.72	0.73	0.70	—	—	—	
	III	—	0.87	0.88	—	—	—	
异戊胺	I	0.85	0.84	0.82	0.83	0.84	0.84	
	II	—	—	—	—	—	—	
	III	—	0.87	0.88	—	—	—	

* 有模糊点存在
** 林丹系单做，只做了酪胺的对应点

体系 I　n-丙醇:水:甲酸＝8:1:1　　19—20℃

1　2　3　4　5　6　7　8　9　10　11

图 1　各种杀虫药剂处理及对照与标准样品的纸层析（体系 I）

1. 对照　2. DDT　3. 溴氰菊酯　4. 西维因　5. 巴丹　6. 杀虫脒　7. 酪胺　8. L-酪氨酸　9. L-亮氨酸　10. 苯乙胺　11. 异戊胺

体系 II　n-丁醇:醋酸:水＝4:1:5　　19—20℃

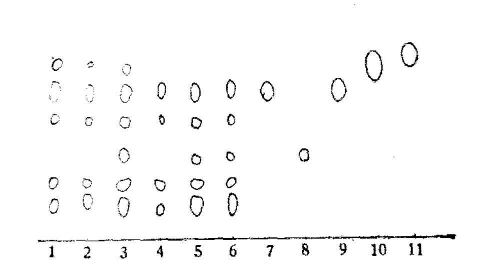


图 2　各种杀虫药剂处理及对照与标准样品的纸层析（体系 II）

说明同图 1

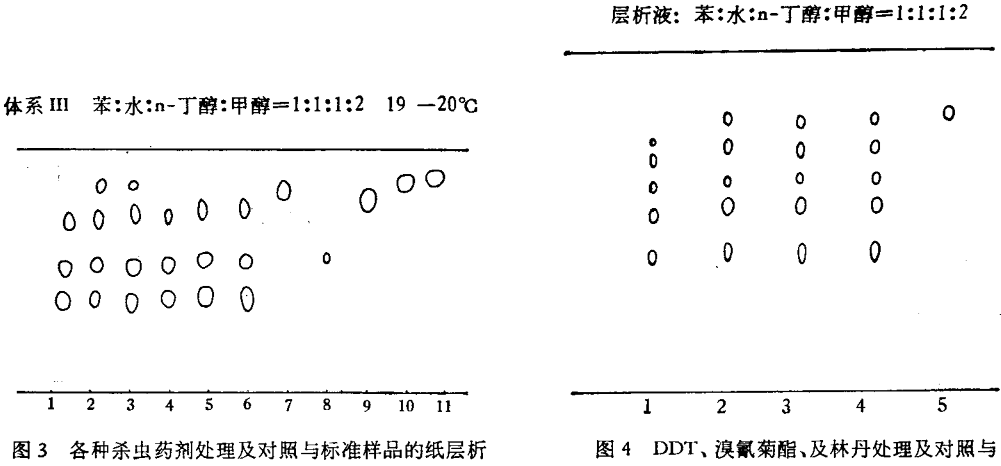


图 3　各种杀虫药剂处理及对照与标准样品的纸层析（体系 III）

说明同图 1。

图 4　DDT、溴氰菊酯、及林丹处理及对照与酪胺的纸层析（体系 III）

1.对照　2.DDT　3.溴氰菊酯　4.林丹　5.酪胺

氰菊酯及六六六处理组有相应点，对照及其它组均没有。这个结果清楚地表明，在 DDT、溴氰菊酯与六六六处理组中，产生了对照组中所没有的新产物，即神经毒素。系统 I 与 II 中，对照及各处理组中均有与酪胺相对应的点，说明血淋巴中存在有与酪胺 Rf 值相同的物质。系统 III 中的情况说明了毒素可能是酪胺。

b. 酪氨酸　在系统 I 及 III 中，对照及各处理组均有相对应点，但在系统 II 中，对照、DDT 及西维因处理组中，对应点极微小。推论，酪氨酸应正常存在于血淋巴中，此处未能明显出现，可能系操作不当所引起。并且对照组中也未能明显出现，故推断毒素不可能是酪氨酸。

c. L-亮氨酸　L-亮氨酸在系统 I、II、III 中，在对照组及各处理组中都有相应的点，说明了处理组与对照组无差异，同时也说明亮氨酸在正常情况下一般存在。虽然亮氨酸有一定神经活性，但由以上结果可以说明，毒素不可能就是亮氨酸。

d. 苯乙胺　苯乙胺在系统 I 中，对照及各处理组均有相应点，表明在系统 I 的条件下，血淋巴中有与苯乙胺 Rf 值相同的化合物。在系统 II 中，对照组及 DDT、溴氰菊酯中有与苯乙胺的对应点，其余处理均没有。在系统 III 中，只有 DDT 与溴氰菊酯具有对应点，说明这两组处理产生了对照组所没有的新产物，因此苯乙胺有可能是神经毒素。

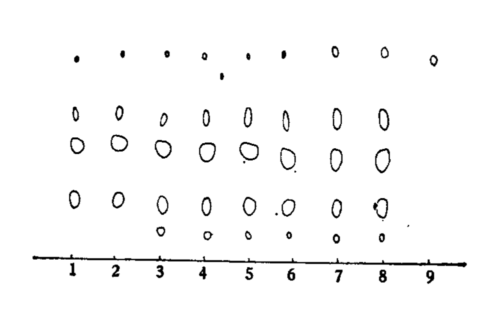


图 5　DDT，溴氰菊酯加杀虫脒的处理与酪胺的纸层析（体系 III）

1、2. DDT.　3、4. DDT 加杀虫脒　5、6. 溴氰菊酯　7、8. 溴氰菊酯加杀虫脒　9. 酪胺

e. 异戊胺　在系统 I 中，对照及各处理组均有与异戊胺相对应点。虽然在系统 III 中，只有 DDT 及溴氰菊酯两组有对应点，但在系统 II 中，各组均没有对应点，因此毒素不可能是异戊胺。

三、杀虫脒与 DDT 及溴氰菊酯混用的增效试验

我们假定神经毒素乃是酪胺，那么由于它是一个单胺，将被单胺氧化酶所氧化降解。杀虫脒已知是单胺氧化酶的抑制剂(Beeman, Matsumura, 1974)，因此将杀虫脒与 DDT 及溴氰菊酯合用可能增加毒素的量，或防止它的分解。杀虫脒与 DDT 及溴氰菊酯合用后的结果见图 5。由图 5 显然可见，溴氰菊酯产生的酪氨相应点比单用溴氰菊酯要大而深，不用定量比色测定，即可看出毒素量有显著的增加。DDT 组的情况也类似，但增加量不如溴氰菊酯那样显著(可能是由于 DDT 用量还太高，产生毒素的量已达到极限左右，因此没有更多的提高)。

讨 论

我们这个试验实际上是重复了张宗炳、吴士雄、金恒亮 (1982) 的工作，证明了中毒蜚蠊血淋巴中的神经毒素乃是酪胺，或主要是酪胺，因为我们的试验中还看出苯乙胺也有可能是毒素。张宗炳、吴士雄、金恒亮 (1982) 的工作中认为苯乙胺有可能也是毒素，虽然它的神经电生理活动是立即引起抑制，而极少有兴奋期。因此，它可能也是毒素的一部分。苯乙胺可以由苯丙氨酸脱羧形成，也可以由酪胺脱羟基形成。目前我们还没有足够的证据，但是我们怀疑这一毒素不是单一成分，而包含许多成分，可能都是正常氨基酸及其脱羧产物 (各种胺)，因此 Tashiro 等 (1978) 所报道的 L-亮氨酸及异戊胺也可能是其组成部分之一；但是在这些组成部分中，酪胺显然占着最主要的地位。

这个试验出乎我们意料之外，我们最初认为所有神经毒剂都会引起神经毒素的产生。但是事实却证明了，只有 DDT、溴氰菊酯及六六六引起了毒素的产生，而 E605、西维因、巴丹、杀虫脒等其它类型的神经毒剂却没有这一效果。Sternburg 等 (1959) 报道，电刺激引起强烈的兴奋时也可以引起毒素的产生，并且 DDT 产生神经毒素也必须在引起兴奋之后。显然，毒素的产生与强烈的兴奋有关，与神经毒剂本身无关，不论哪种神经毒剂，只要引起强烈兴奋的，都能引起毒素的产生，反过来，不能引起强烈兴奋的杀虫药剂都不能引起毒素的产生。

我们将在下一篇报告中，报道酪氨酸脱羧酶在 DDT 的作用下可以诱导加强，但是奇怪的是 DDT 本身对酶没有诱导作用 (体外试验无效)，而是间接地通过某一物质对酶起诱导作用 (体内试验有效)。这也同样地说明了，DDT、溴氰菊酯、六六六或甚至于电刺激，是引起了神经发生一种改变，这种改变使酪氨酸脱羧酶加强了，因而产生大量的酪胺。

神经毒素是酪胺这一类单胺的另一证据，就是我们这次做的增效试验。杀虫脒是单胺氧化酶的抑制剂，单胺氧化酶可使酪胺分解成为扁桃酸，从而失去了毒性。Sternburg 等 (1959) 报道，这一毒素极不稳定，很容易由酶分解，因此将酶用乙醇抑制，可以延长毒素维持的有效期，足见血淋巴中存在有一种酶，将毒素分解。本试验证明了杀虫脒与溴氰菊酯及 DDT 合用后，酪胺的产量有显著的增加，这说明了血淋巴液中存在的可能就是单胺氧化酶，酪胺产生后有一部分为其分解。增效作用就是抑制了这一酶的结果(关于单胺氧化酶的试验将由另文报道)。

小　　结

(1) 用了五个类型的神经毒剂处理美洲蜚蠊，观察血淋巴中有无神经毒素的产生。

(2) 试验证明，只有引起高度兴奋的杀虫药剂，如DDT、溴氰菊酯及六六六引起了毒素的产生，其它如E605、西维因、巴丹、杀虫脒均不引起毒素的产生。

(3) 用纸层析及薄层层析，以标准样品(酪胺、苯乙胺、酪氨酸、亮氨酸、异戊胺)进行了比较，证实了毒素乃是酪胺。苯乙胺有可能也是毒素的一部分。

(4) 增效试验证明了，单胺氧化酶的抑制剂能使酪胺量有所增加。

(5) 讨论了这一毒素的性质及产生的条件。指出了这一毒素有可能是许多种单胺及氨基酸的复合物，不是单一成分，而其中以酪胺为主要组分。产生的条件乃是高度兴奋，高度兴奋引起神经中发生某些改变，诱导了酪氨酸脱羧酶，产生大量酪胺。因此，电刺激引起的兴奋也能促使毒素的产生。

参　考　文　献

张宗炳　1981　昆虫神经生理与神经毒剂，生物科学动态。5:1—9; 6:1—10。

张宗炳、吴士雄、金恒亮　1983　昆虫神经毒素的研究：酪胺作为 DDT 麻痹的蜚蠊血淋巴中的毒素。昆虫学报 **27** (1):15—22。

Beeman, R. W. & F. Matsumura, 1974 Chlordimeform as inhibitor of monoamine oxidase. *Pestic. Biochem. Physiol.* **4**: 325.

Blum, M. S. & C. W. Kearns, 1956 Temperature and the action of pyrethrum in the American cockroach. *J. Econ. Entomol.* **49**: 862.

Sternburg, J. 1960 Effect of insecticides on neurophysiological activity in insects. *Agr. Food Chem.* **8**(4): 257.

Sternburg, J. & C. W. Kearns, 1952 The presenc of toxin other than DDT in the blood of DDT-poisoned roach. *Science* **116**: 144.

Sternburg, J., S. C. Chang, & C. W. Kearns, 1957 DDT-induced toxin in insect blood. *Fed. Proc.* **16**: 124.

———— 1959 The release of a neuroactive agent by the American cockroach after exposure to DDT or electrical stimulation. *J. Econ. Entomol.* **52**: 1070.

Tashiro, S., Taniguchi, E. & M. Eto, 1972 Isolation of a neuroactive substance, L-leucine, from the blood of silkworm poisoned with DDT. *Agr. Biol. Chem.* **36**: 2465.

Tashiro, S., Taniguchi, E., M. Eto & K. Maekawa 1975 Isoamylamine as the possible neuroactive metabolite of L-leucine *Agr. Biol. Chem.* **39**: 569.

STUDIES ON INSECT NEUROTOXIN: THE RELEASE OF INSECT NEUROTOXIN BY TREATMENT WITH DIFFERENT NEUROTOXIC INSECTICIDES

J. T. Chang S. H. Wu, N. S. Chen Y. H. Yao
(*Department of Biology, Peking University*)

Seven neurotoxic insecticides beloging to five classes of neurotoxic action were tested on their effect in releasing tyramine, the neuroactive substance, in the haemolymph of DDT prostrate cockroaches, *Periplaneta americana.* DDT, decamethrin and BHC were shown to be able in inducing the release of the neuroactive substance in the haemolymph, but parathron, carbaryl, cartap and chlordimeform failed to produce the neurotoxin. Paper co-chromatography and thin layer chromatography with standard samples of tyrosine, tyramine, phenyl ethylamine, L-leucine and isoamylamine with three systems reconfirmed that the neuroactive substance is tyramine, or if it is a composite, the major component is tyramine. Chlordimeform shows synergistic effect on DDT and decamethrin probably due to the inhibition of monoamine oxidase and prevents the degradation of tyramine. The conditions causing the release of the neurotoxin is probably extreme excitation of the nervous system, so excited states produced by electrical stimulation also induce the release of the neurotoxin. DDT, decamethrin and BHC all cause extreme excitation, while the other four neurotoxic insecticides causes no or little excitation.

Key words Neurotoxin—Tyramine.